

УДК 576.895.122

АМИНЕРГИЧЕСКИЕ ЭЛЕМЕНТЫ В НЕРВНОЙ СИСТЕМЕ ЭХИНОСТОМАТИД И ФИЛОФТАЛЬМИД

Б. А. Шишов, И. Канев

На основе гистохимического метода с глиоксиловой кислотой показано распределение аминергических элементов в нервной системе редий, церкарий и марит *Echinostoma audyi*, *E. lindoense*, *Philophthalmus gralli*, *Philophthalmus* sp.

Гистохимические исследования, выполненные на трематодах нескольких видов, показывают, что у них в результате обработки формальдегидом или глиоксиловой кислотой появляется флуоресценция в определенных элементах нервной системы. Свечение обусловлено специфическим взаимодействием реактивов с биогенными аминами. У исследованных трематод обнаружено небольшое число относительно крупных аминергических клеток, но нервные волокна с зеленым свечением распространяются в различные отделы нервной системы и довольно полно отражают ее общую топографию (Шишов, 1979, 1980; Шишов и др., 1982; Шишов, Люкшина, 1984; Bennett, Bueding, 1974; Bennett, Gianutsos, 1977).

Нервная система эхиностоматид ранее не исследована ни в морфологическом плане, ни в плане распределения в ней физиологически активных соединений. В отношении филофталмид имеются данные о распределении холинэстеразы в нервной системе *Cloacitrema michiganensis* (Le Flore e. a., 1980) и краткие морфологические сведения о нервной системе редий и церкарий близкого в систематическом положении *Parorchis acanthus* (Rees, 1966, 1967). В нашей работе приведены результаты гистохимического выявления аминергических элементов в редиях, церкариях и маритах *Echinostoma audyi*, *E. lindoense*, *Philophthalmus gralli* и *Philophthalmus* sp.

МАТЕРИАЛ И МЕТОД

Редии и церкарии *E. audyi* получены из моллюска *Lymnaea stagnalis*, а *E. lindoense* — из *Planorbis corneus* (Болгария). Марит эхиностоматид брали из кишечника цыплят через 6 сут после экспериментального заражения. Редии и церкарии *Philophthalmus* sp. взяты из моллюска *Fagotia acicularis* (Болгария), а *Ph. gralli* — из *Melanoides tuberculata* (Вьетнам). Адолюскарий, инцистированных в течение 5—40 ч, подогревали в воде до 40—45° для получения эксцистированных форм.

Аминергические элементы выявляли гистохимическим методом с использованием глиоксиловой кислоты (De la Torre, Surgeon, 1976). Гельминтов помещали на стекло, отсасывали воду и тут же добавляли несколько капель раствора, содержащего 1 % моногидрата глиоксиловой кислоты, 0.236 М KH_2PO_4 и 0.2 М сахарозы; pH раствора 7.4. Через 15—20 мин раствор тщательно отсасывали. Стекла с обработанными гельминтами располагали в струе теплого воздуха (около 65°) от фена на 15—20 мин. После этого стекла дополнительно прогревали 5 мин в сушильном шкафу при 80°. При завершении обработки препараты заключали в вазелиновое или иммерсионное масло.

Для рассмотрения препаратов и микрофотографирования использовали люминесцентный микроскоп с фотонасадкой. Свет ртутно-кварцевой лампы ограничивали светофильтрами, пропускающими сине-фиолетовую часть спектра (ФС-1-4, СЗС-14-4, БС-8-2, запирающий-2 или ЖС-18).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Специфическая флуоресценция зеленого цвета выявлена в элементах нервной системы у редиий, церкарий и марит рассмотренных эхиностоматид и филофталмид. Ее локализация в основном сходна у представителей разных семейств. Поэтому ниже приведено общее описание распределения аминергических элементов. Обнаруженные небольшие различия у тех или иных объектов оговорены по ходу изложения текста.

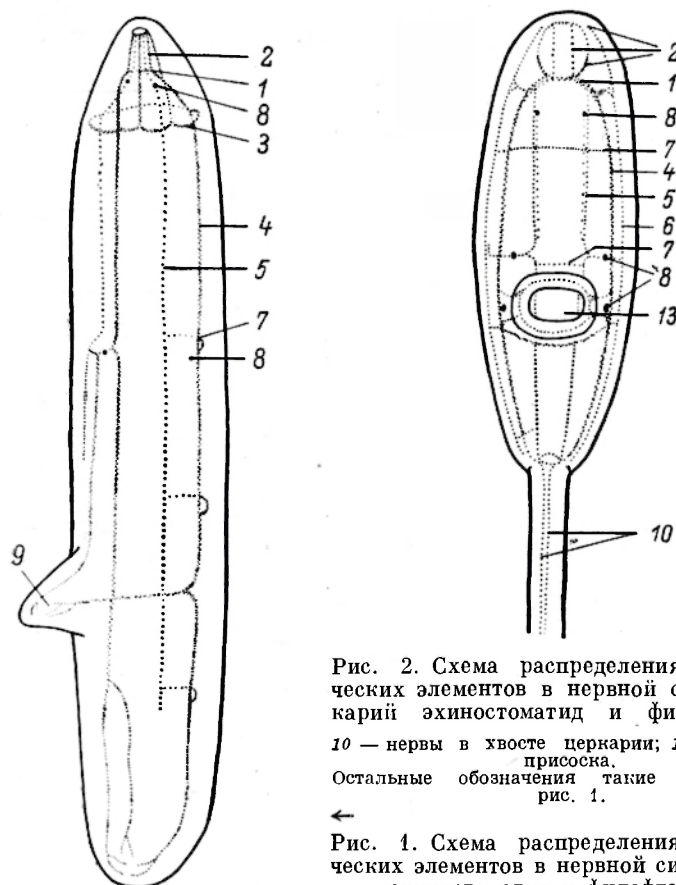


Рис. 2. Схема распределения аминергических элементов в нервной системе церкарий эхиностоматид и филофталмид. 10 — нервы в хвосте церкарии; 13 — брюшная присоска. Остальные обозначения такие же, как на рис. 1.

Рис. 1. Схема распределения аминергических элементов в нервной системе редиий эхиностоматид и филофталмид.

1 — нейропиле и комиссура головного ганглия; 2 — нервы и волокна, иннервирующие передний конец тела; 3 — поперечная комиссура в головном отделе редиий; 4 — вентральный; 5 — дорсальный; 6 — латеральный нервы; 7 — поперечная комиссура; 8 — нейрон; 9 — нервные волокна в латеральном выросте редиий.

Свечение у гельминтов проявляется в волокнах комиссуры и нейропилей головного ганглия, в 2—3 парах относительно крупных нейронов, в продольных нервных стволах и поперечных комиссурах. Нервные волокна содержат ярко светящиеся варикозные расширения и часто выглядят как пунктирные линии. Флуоресценция исчезает при повторном увлажнении тканевых препаратов. Она не появляется, если объекты не обработаны глиоксиловой кислотой или недостаточно высушены. Распределение аминергических элементов у редиий, церкарий и мариты представлено на схемах и микрофотографиях (рис. 1—4; см. вкл.).

Р е д и и. (рис. 1; 4, а—б). В нашем распоряжении оказались редиий различных размеров, заполненные церкариями и без таковых. Во всех этих слу-

чаях проявлялась общая закономерность распределения аминергических элементов в нервной системе. В то же время даже у сходных (по размеру, а также по наличию или отсутствию в них церкарий) экземпляров редий одного вида заметны некоторые различия в ветвлениях нервных стволов, в расположении отдельных волокон и комиссур, особенно в переднем конце тела. В связи с этим складывается впечатление, что топография нервной системы у редий весьма изменчива.

Несколько схематически локализацию флуоресцирующих элементов в нервной системе редий эхиностоматид и филофталмид можно представить следующим

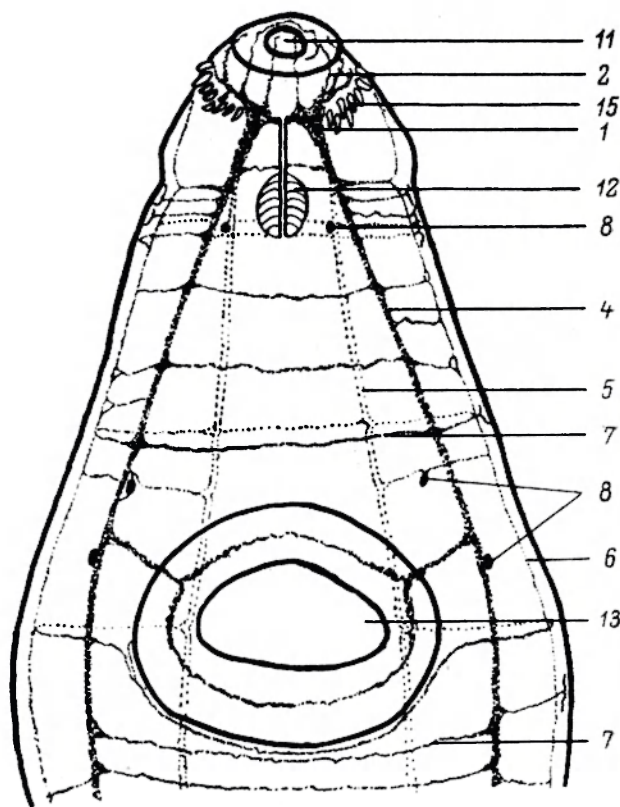


Рис. 3. Схема распределения аминергических элементов в нервной системе марит эхиностоматид (передняя часть тела).

11 — ротовая присоска; 12 — глотка; 15 — шипики на головном воротничке.
Остальные обозначения такие же, как на рис. 1, 2.

образом. На уровне начала кишечника, как бы охватывая пищеварительную трубку со спинной стороны, расположено в дорсовентральном направлении скопление тонких флуоресцирующих волокон. Оно имеет форму дуги с расширенными концами и, очевидно, соответствует комиссуре и нейропилям головного ганглия. От концов «дуги», приближаясь к поверхности тела, идут назад вентральные или вентролатеральные стволы относительно большого диаметра. Аминергические волокна в них проходят до заднего конца тела; здесь они ветвятся и образуют небольшое сплетение, объединяющее стволы. От вершины «дуги» также назад отходит пара более тонких дорсальных или дорсолатеральных стволы. Они связаны с вентральными стволами посредством комиссур.

Помимо указанных стволы, в передней половине редий часто выявляются фрагменты тонких флуоресцирующих волокон, направленных вдоль тела. Однако проследить полностью их ход и связи не удалось. Возможно, что они соответствуют латеральным нервам. В средней и задней частях тела редии те или иные стволы могут раздваиваться и тогда соответственно увеличивается их количество.

Нервные стволы после выхода из области комиссуры и нейропилей головного ганглия снова объединяются на уровне валика или плечиков редии комиссурой, которая расположена ближе к поверхности тела. От комиссуры, кроме того, отходят тонкие волокна. Не касаясь нейропилей головного ганглия, они простираются к переднему концу тела редии. Сюда же идут тонкие нервные стволы и волокна от головного ганглия. Передние нервы ветвятся и как бы охватывают глотку. Их отростки образуют кольцо вокруг ротового отверстия. Такие же образования флуоресцируют вокруг начала кишечника и родильной поры. Ответвления от нервных стволов иннервируют латеральные локомоторные выросты.

У редий стабильно выявляются 2 пары относительно крупных аминергических нейронов. Первая пара клеток диаметром 5—6 мкм находится немного отступя от заднего края комиссуры головного мозга. Вторая пара таких же или чуть больших по размеру нейронов (6—9 мкм) располагается на уровне конца передней трети—середины длины тела редии. На одних препаратах эти клетки лежат в брюшных нервных стволах или прилегают к ним. Перед нейронами проходят поперечные комиссуры, которые соединяют брюшные и спинные нервные стволы. У других экземпляров клетки располагаются по ходу комиссур и значительно удалены от стволов. В единичных случаях около нейронов 2-й пары выявляется дополнительная клетка. У нейронов обычно хорошо видны 2 отростка, но встречаются клетки с одним или несколькими отростками.

При сходстве распределения аминергических элементов у редий филофтальмид и эхиностоматид имеются некоторые различия. В частности, нейропилы головного ганглия филофтальмид представляются несколько большими по объему. У этих трематод хуже видна поперечная комиссура на уровне плечиков, хотя довольно ясно выявляются ее фрагменты между брюшными и спинными нервами.

Ц е р к а р и и. Гистохимическая реакция показывает, что аминергические элементы присутствуют в нервной системе церкарии уже во время формирования личинки в теле редии. У свободноплавающих церкарий распределение флуоресценции представляется в следующем виде (рис. 2; 4, *е*, *з*). На уровне переднего края глотки, по бокам от нее, находятся скопления тонких светящихся волокон; они соединены между собой нервными волокнами такого же рода. Локализация этих элементов соответствует положению у трематод нейропилей и поперечной комиссуры головного ганглия. Тонкие нервы и волокна идут от ганглия вперед. Они охватывают и иннервируют ротовую присоску; некоторые из них, по-видимому, оканчиваются на переднем конце тела церкарии.

Назад от ганглия аминергические волокна проходят в составе брюшных и спинных продольных нервных стволов. Брюшные стволы расположены ближе к бокам церкарии и выглядят более мощными по сравнению со спинными. У большинства церкарий флуоресцирующие волокна в брюшных и спинных стволах простираются до заднего конца тела, но в ряде случаев в спинных стволах они прослеживаются до уровня заднего края брюшной присоски, а дальше направляются к брюшным стволам.

По ходу нервных стволов в теле церкарий обнаружено 3 пары аминергических нейронов с диаметром 3—6 мкм. Первая пара клеток расположена приблизительно на уровне заднего края глотки, вторая — у переднего края брюшной присоски и третья — на уровне середины присоски. Нейроны 2-й пары обычно бывают несколько крупнее остальных и наиболее четко выделяются на препаратах. Эти клетки несколько удалены от брюшных стволов и их отростки образуют поперечную комиссуру, которая соединяет брюшные стволы со спинными и последние между собой. Около нейронов 3-й пары от брюшных стволов отходят короткие нервы к брюшной присоске, в которой флуоресцирующие волокна образуют кольцо.

По бокам церкарии светятся тонкие волокна, которые, очевидно, входят в состав латеральных нервов. В задней части тела флуоресцирующих элементов в стволах и нервах постепенно становится меньше и их свечение слабее. Волокна дорсальных и особенно латеральных нервов в этой области часто прослеживаются с трудом. Достаточно толстыми и яркими остаются вентральные стволы. В конце тела они входят в поперечную кольцевую комиссуру. Аминергические

волокна имеются и в других поперечных комиссурах, которые расположены на различных уровнях в церкариях и связывают продольные нервные стволы.

В хвосте церкарий обычно флуоресцируют два продольных волокна или нерва, которые находятся довольно близко друг к другу. Иногда в основании хвоста выявляется короткое дополнительное волокно. Волокна имеют много варикозных расширений. В начале хвостовых нервов часто видны более крупные и ярко светящиеся точки. Возможно, что они являются мелкими аминергическими нейронами.

Среди рассмотренных церкарий эхиностоматид и филофталмид выделяются *E. audyi*. У них, помимо флуоресценции, в элементах нервной системы возникает чрезвычайно сильное свечение желто-зеленого цвета в образованиях, которые расположены двумя рядами в передней половине тела и, очевидно, соответствуют клеткам, называемым в литературе параззофагеальными (рис. 4, е). Причина их флуоресценции остается загадочной. Свечение так же, как и в элементах нервной системы, исчезает при увлажнении гистохимических препаратов.

М а р и т а. У эксцистированных адолескарий филофталмид (рис. 4, ж) и у взрослых эхиностоматид (рис. 3; 4, и) в общих чертах повторяется план распределения аминергических элементов, который описан у церкарий трематод, но увеличиваются размеры флуоресцирующих элементов нервной системы и лучше видны некоторые детали. У марит 1-я и 3-я пары нейронов приобретают размеры порядка 6×10 , а 2-я — 9×15 мкм. Увеличивается диаметр и протяженность нервных стволов. Соответственно лучше видны волокна в латеральных нервах, в ротовой и брюшной присосках. Становится заметным свечение дополнительных тонких комиссур и многочисленных тонких волокон в переднем конце тела, особенно в области воротничка.

ОБСУЖДЕНИЕ

Специфическое зеленое свечение, возникающее в элементах нервной системы при обработке глиоксиловой кислотой, рассматривается как результат избирательного выявления катехоламинов (Lindvall, Björklund, 1974; De la Torre, Surgeon, 1976). Наряду с этим имеются указания на то, что сходная флуоресценция может быть обусловлена взаимодействием реактива с аминокислотами (Keenan, Koopowitz, 1982). Поскольку медиаторы в флуоресцирующих нейронах эхиностоматид и филофталмид еще не идентифицированы, выявленные элементы нервной системы в статье названы обобщенно — аминергическими. В пользу того, что в данном случае свечение связано с катехоламинами, показывают результаты, полученные на других трематодах. Так, у шистозом и фасциол наряду с зеленым свечением нейронов обнаружены катехоламины в гомогенатах тканей и показано, что меченый дофамин захватывается нервными волокнами (Теренина, 1981; Chou e. a., 1972; Bennett, Gianutsos, 1977; Gianutsos, Bennett, 1977; Seed e. a., 1980; Dei-Cas e. a., 1981). Для клеток, секретирующих катехоламиновые медиаторы, на ультраструктурном уровне считается характерным присутствие небольших округлых везикул с электронноплотным ядром. Везикулы такого рода обнаружены в нейронах трематод, в частности в терминалях и синапсах у редии и церкарии *Parorchis acanthus* (Rees, 1966, 1967), т. е. у вида, который является близким в систематическом отношении к гельминтам, рассмотренным в нашей статье. Таким образом, имеющиеся разнообразные сведения согласуются между собой и говорят в пользу высказанного предположения.

Гистохимические данные показывают, что основной план распределения «зеленых» аминергических элементов повторяется у обоих поколений и на разных стадиях развития трематод. Так, у редий, церкарий и марит флуоресценция имеет место в нейропилах и комиссуре головного ганглия, в продольных нервных стволах, поперечных комиссурах и т. д. Наряду с этим аминергические элементы, так же как и вся нервная система, претерпевают некоторые изменения на разных этапах жизненного цикла трематод.

У редий нервные волокна иннервируют такие специфичные для них образования, как родильная пора и латеральные выросты. Поперечная комиссура, расположенная на уровне плечиков редии, возможно, связана с функцией ва-

лика. С другой стороны, не исключено, что наличие комиссуры вблизи от головного ганглия и ее связь с передними и задними нервами обусловлены недостаточным развитием ганглия как интегрирующего центра нервной системы. У церкарий и марит подобной комиссуры не обнаружено. Не проявляется у церкарий и индивидуальная изменчивость в расположении нервов и комиссур, отмеченная у редий. Если нейроны 2-й пары у редий могут выглядеть как уни-, би- и мультиполярные клетки, то у соответствующих клеток церкарий и марит обычно ярко флуоресцируют два отростка. Как уже указано выше, помимо двух пар аминергических нейронов, у некоторых экземпляров редий видны дополнительные одиночные нервные клетки. Таким образом, распределение аминергических элементов у редий и закономерности индивидуальной изменчивости в их расположении остаются недостаточно ясными и указывают на целесообразность специального исследования.

У церкарий и марит стабильно проявляется 3-я пара флуоресцирующих нейронов на уровне середины брюшной присоски. По-видимому, указанные клетки связаны с функцией этого органа или других, которые появляются у гермафродитного поколения.

У церкарий своеобразный орган локомоции — хвост, так же как и локомоторные образования редий, имеет аминергическую иннервацию. Распределение флуоресцирующих волокон в хвосте церкарий рассмотренных эхиностоматид и филофталмид более похоже на картину иннервации хвоста у плагиорхидной церкарии *Haplometra cylindracea* (Grabda-Kazubska, Moczon, 1981), чем у *Cloacitrema michiganensis*, где описаны 3 пары нервов (Le Flore e. a., 1980).

У церкарий рассмотренных трематод, а также у эксцистированных подростков филофталмид гистохимическая реакция на аминергические соединения выявляет сравнительно небольшое число поперечных комиссур и довольно слабую разветвленность нервных стволов. Не исключено, что в данном случае картина в какой-то степени ограничена разрешающей способностью метода исследования для выявления тончайших волокон. Обнаружение у марит эхиностоматид дополнительных комиссуральных связей, тонких нервных волокон в области адорального диска и среди клеток соматической мускулатуры может быть обусловлено увеличением диаметра волокон и интенсивностью их свечения у взрослых червей. Но очевидное увеличение мощности и протяженности нервных стволов, происходящее у марит, дает основание предполагать, что разветвленность и распространение по крайней мере аминергических волокон возрастают с ростом и развитием органов и тканей гельминта. Распределение «зеленых» нервных волокон у эхиностоматид и филофталмид в общих чертах соответствует литературным сведениям о нервной системе этих трематод. В то же время оно позволяет внести ряд дополнений к имеющимся данным.

Три пары относительно крупных аминергических нейронов, обнаруженных у церкарий и марит эхиностоматид, а также у филофталмид, занимают сходное положение с подобными клетками у шистозом, фасциол, нотокотилиусов. Нейроны с желтой или желто-зеленой флуоресценцией, описанные у шистозом, нами не обнаружены.

Иннервация аминергическими волокнами латеральных выростов и плечиков редии, хвоста церкарии, присосок у личинок и взрослых гельминтов и локализация этих волокон среди клеток соматической мускулатуры и мышц адорального диска мариты указывают на то, что нейроны аминергической природы принимают участие в формировании моторной активности соматической и специализированной мускулатуры на разных этапах развития трематод. С другой стороны, подход флуоресцирующих нервных волокон к поверхности тела гельминтов, особенно на головном конце, дает основание предполагать, что аминергические элементы связаны и с рецепторной функцией.

Л и т е р а т у р а

- Т е р е н и н а Н. Б. Идентификация катехоламинов в тканевых экстрактах трематоды *Fasciola hepatica*. — Журн. эвол. биохимии и физиологии, 1981, т. 17, № 4, с. 342—347.
- Ш и ш о в Б. А. Катехоламины у гельминтов. — В кн.: Катехоламинергические нейроны. М., Наука, 1979, с. 17—24.

- Ш и ш о в Б. А., Т е р е н и н а Н. Б., Л ю к ш и н а Л. М. Катехоламины — вероятные медиаторы в элементах нервной системы моногеней и трематод. — Вопросы эволюционной физиологии. (8-е совещ.). Л., Наука, 1982, с. 338.
- Ш и ш о в Б. А., Л ю к ш и н а Л. М. Катехоламины в нервной системе *Notocotylus attenuatus* Trematoda, Notocotylida. — Паразитология, 1984, т. 18, вып. 3, с. 215—219.
- (Ш и ш о в Б. А.) Shishov B. A. Biogenic amines in helminths. — In: Neurotransmitters. — Comparative Aspects. J. Salanki, T. M. Turpaev (eds). Academiai Kiado, Budapest, 1980, p. 31—56.
- Bennett J., Bueding E. Localization of biogenic amines in *Schistosoma mansoni*. — Comp. Biochem. and Physiol., 1971, vol. 39, N 4, p. 859—867.
- Bennett J., Gianutsos G. Distribution of catecholamines in immature *Fasciola hepatica*: A histochemical and biochemical study. — Int. J. Parasitol., 1977, vol. 7, N 3, p. 221—225.
- Chou T. C. T., Bennett J., Bueding E. Occurrence and concentrations of biogenic amines in trematodes. — J. Parasitol., 1972, vol. 58, p. 1098—1102.
- Dei-Cas E., Dhainaut-Courtois N., Biguet J. Contribution à l'étude du système nerveux des formes adultes et larvaires de *Schistosoma mansoni* Sambon, 1907 (Trematoda, Digenea) — II — Rôle de la sérotonine et de la dopamine. — Ann. Parasitol. (Paris), 1981, t. 56, N 3, p. 271—284.
- De la Torre J. C., Surgeon J. W. Histochemical fluorescence of tissue and brain monoamines: results in 18 minutes using the sucrosephosphate—glyoxylic acid (SPG) method. — Neuroscience, 1976, vol. 1, p. 451—453.
- Gianutsos G., Bennett J. The regional distribution of dopamine and norepinephrine in *Schistosoma mansoni* and *Fasciola hepatica*. — Comp. Biochem. Physiol., 1977, vol. 58, p. 157—159.
- Grabda-Kazubska B., Moczon T. Nervous system and chaetotaxy in the cercaria of *Haplometra cylindracea* (Zeder, 1800) (Digenea, Plagiorchiidae). — Z. f. Parasitenkunde, 1981, Bd 65, p. 53—61.
- Keenan L., Koopowitz H. Physiology and in situ identification of putative aminergic neurotransmitters in the nervous system of *Gyrocotyle fimbriata*, a parasitic flatworm. — J. Neurobiology, 1982, vol. 13, N 1, p. 9—21.
- Le Flore W. B., Bass H. S., Smith B. F. Histochemical localization of hydrolytic enzymes in cercariae of *Cloacitrema michiganensis* (Trematoda, Philophthalmidae). — Trans. Am. Microsc. Soc., 1980, vol. 99, p. 201—206.
- Lindvall O., Björklund A. The glyoxylic acid fluorescence histochemical method: a detailed account of the methodology for the visualisation of central catecholamine neurons. — Histochemistry, 1974, vol. 39, p. 97—127.
- Rees G. Light and electron microscope studies of the redia of *Parorchis acanthus* Nicoll. — Parasitology, 1966, vol. 56, p. 589—602.
- Rees G. The histochemistry of the cystogenous gland cells and cyst wall of *Parorchis acanthus* Nicoll., and some details of the morphology and fine structure of the cercaria. — Parasitology, 1967, vol. 57, p. 87—110.
- Seed J. L., Kiltz C. D., Bennett J. L. *Schistosoma mansoni*: Tyrosin, a putative in vivo substrate of phenol oxidase. — Exp. parasitol., 1980, vol. 50, p. 33—44.

ГЕЛАН СССР, Москва,
Центральная гельминтологическая лаборатория БАН,
НРБ

Поступила 26 I 1984
Принята к печати 28 I 1985

AMINERGETIC ELEMENTS IN THE NERVOUS SYSTEM OF ECHINOSTOMATIDS AND PHILOPHTHALMIDS

B. Shishov, I. Kanev

S U M M A R Y

Green light fluorescence characteristic of aminergic neurons was revealed by means of histochemical method with glyoxylic acid in the nervous system of redia, cercaria and marita of *Echinostoma audyi*, *Philophthalmus gralli*, *Philophthalmus* sp. The distribution of fluorescent elements is repeated in general at the above developmental stages of trematodes and is associated with neuropiles and commissure of cephalic ganglia, with longitudinal nerve stems and transverse commissures. 2 and 3 pairs of relatively large aminergic neurons have been found in redia, cercaria and marita, respectively. Fluorescent fibres innervate lateral processes of redia, tail of cercaria, mouth and abdominal suckers; they permeate somatic musculature. This suggests the motor function of aminergic elements. At the same time the endings of fibres at the body surface, especially in the anterior part, suggest their connection with receptors.

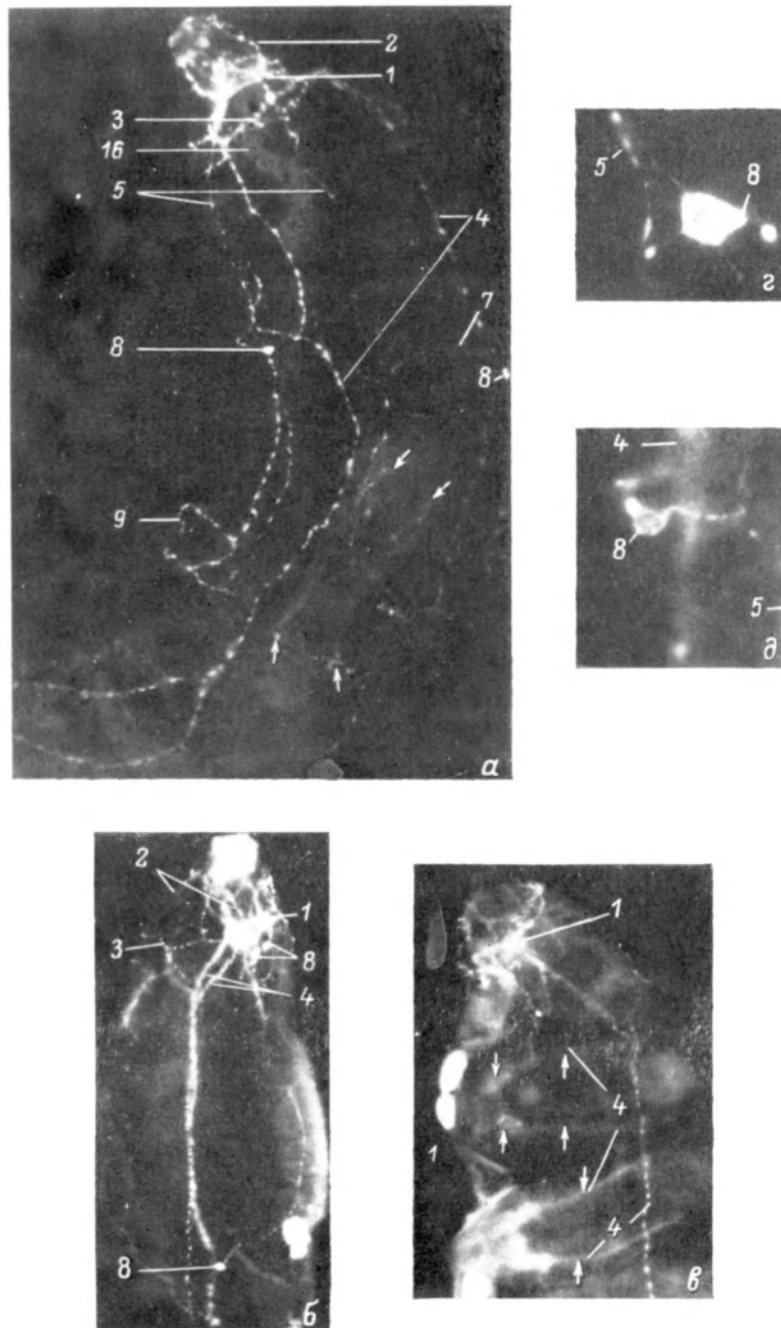


Рис. 4. Флуоресценция аминергических элементов.

а — у редии *E. lindoense* и находящейся в ней церкарии (стрелка), объектив 16×, гомаль 6.3×; б, в — у редии и церкарий, лежащих в ее теле (стрелка), объектив 20×, гомаль 3×; г — нейроны 2-й пары у редии *E. lindoense*, объектив 40×, гомаль 5×; д — нейроны 2-й пары у эксцистированной подростки, объектив 90×, гомаль 5×; е — у церкарии *E. audyi*, объектив 20×, гомаль 3×; ж — у эксцистированной подростки *Ph. gralli*, объектив 20×, гомаль 3×; з — у церкарии *E. lindoense*, объектив 16×, гомаль 6.3×; и — в головном конце мариты *E. lindoense*, объектив 16×, гомаль 3×.

Остальные обозначения такие же, как на рис. 1—3.

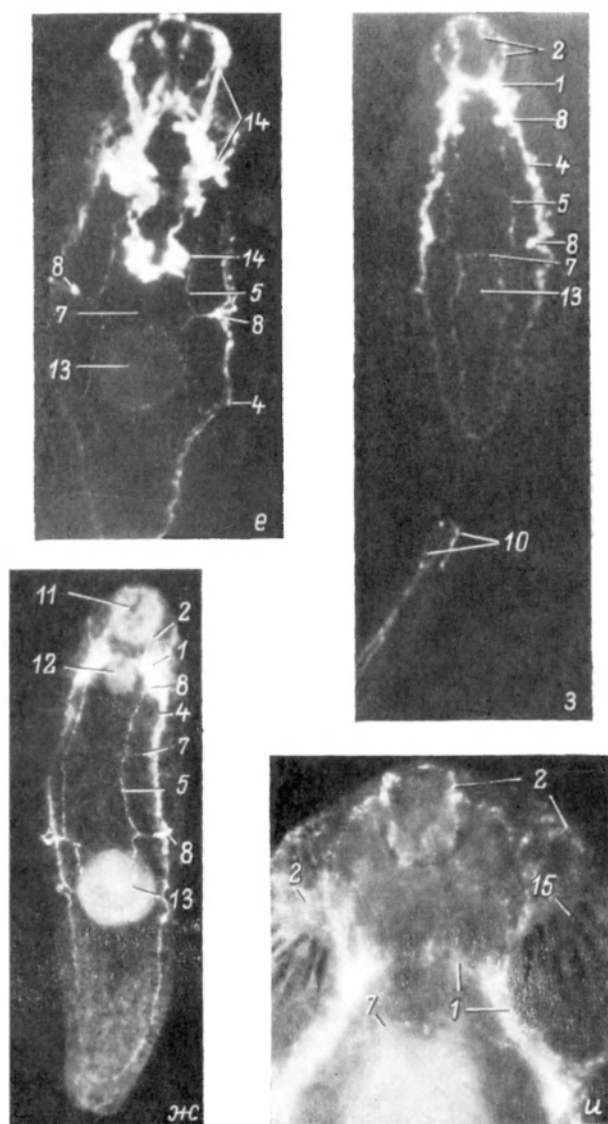


Рис. 4 (продолжение).